This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

O I P E JC177
MAY 2 0 2004
PATENT & TRADEMARK OFFICE

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Sang Yup LEE, et al.

Docket No: Q77446

Appln. No.: 10/662,358

Group Art Unit: Unknown

Confirmation No.: Unknown

Examiner: Unknown

Filed: September 16, 2003

For: PROCESS FOR PREPARING POLYHYDROXYALKANOATE EMPLOYING MAOC GENE

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 10-2003-0025863, the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

John T. Callahan
Registration No. 32,607

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860
WASHINGTON OFFICE
23373
CUSTOMER NUMBER

Enclosure: **Korean Patent Application No. 10-2003-0025863**

Date: May 20, 2004

Lee et al
Appln 10/662358
Filed 9/16/03
Q77446
1 of 1

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출 원 번 호 : Application Number	10-2003-0025863
출 원 년 월 일 : Date of Application	2003년 04월 23일 APR 23, 2003
출 원 인 : Applicant(s)	한국과학기술원 Korea Advanced Institute of Science and Technology

2003 년 10 월 27 일

특 허 청
COMMISSIONER

온라인발급문서(발급문일자:2003.10.27 발급번호:5-5-2003-015841802)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.23
【발명의 명칭】	MaoC 단백질을 이용한 폴리히드록시알칸산의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Process for Preparing Polyhydroxyalkanoate Employing MaoC protein
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE,Sang Yup
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박시재
【성명의 영문표기】	PARK,Si Jae
【주민등록번호】	750202-1017714
【우편번호】	138-873
【주소】	서울특별시 송파구 풍납1동 149-31
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	7
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이한영 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	6 면 6,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	7 항 333,000 원
【합계】	368,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	184,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 대장균에서 발현되는 MaoC 단백질을 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 제조방법 및 전기 방법으로 제조된 PHA에 관한 것이다. 본 발명의 MaoC를 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 생산방법은 대장균에서 *fadB* 유전자를 제거하는 단계; 전기 *fadB* 유전자가 제거된 대장균을 *maoC* 유전자를 포함하는 발현벡터와 폴리히드록시알칸산(PHA) 합성유전자를 포함하는 발현벡터로 동시에 형질전환시켜서 형질전환체를 수득하는 단계; 및, 수득한 형질전환체를 C_{6-10}의 탄소원이 포함된 배지에 배양하고, 이로부터 C_{6-10}의 탄소수를 가지는 모노머로 구성된 PHA를 수득하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 지금까지 기능이 규명되지 않았던 MaoC 단백질을 이용할 경우, 종래의 PHA보다 많은 탄소수를 가지는 고품질의 PHA를 보다 높은 효율로 생산할 수 있으므로, 고품질의 PHA의 제조에 널리 활용될 수 있을 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

MaoC 단백질, 폴리히드록시알칸산(PHA)

【명세서】

【발명의 명칭】

M a o C 단백질을 이용한 폴리히드록시알칸산의 제조방법{Process for Preparing Polyhydroxyalkanoate Employing MaoC protein}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 p10499MaoC의 유전자 지도이다.

도 2는 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC104MaoC의 유전자 지도이다.

도 3은 PHA 합성 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pMCS104613C2의 유전자 지도이다.

도 4는 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pTac99MaoC의 유전자 지도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 MaoC 단백질을 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균에서 발현되는 MaoC 단백질을 이용한 PHA의 제조방법 및 전기 방법으로 제조된 PHA에 관한 것이다.

<6> 폴리히드록시알칸산(PHA)은 미생물이 과도한 탄소원이 존재하면서 인, 질소, 마그네슘, 산소 등의 다른 영양분이 부족할 때, 탄소원 저장물질로서 미생물 내부에 축적되는 폴리

에스터 형태의 화합물이다. 이러한 PHA는 석유로부터 유래된 합성고분자와 비슷한 물성을 가지면서도 완전한 생분해성을 나타내기 때문에, 종래의 합성 플라스틱을 대체할 물질로 인식되고 있다.

<7> 일반적으로, PHA는 적은 탄소수를 가진 짧은사슬 PHA(SCL-PHA, short-chain-length PHA)와 상대적으로 많은 탄소수를 가진 중간사슬 PHA(MCL-PHA, medium-chain-length PHA)로 구별되는데, 적은 탄소수를 가진 SCL-PHA보다는 상대적으로 많은 탄소수를 가진 MCL-PHA가 합성고분자와 물성이 유사하기 때문에, 주로 MCL-PHA에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. PHA를 미생물에서 생산하기 위해서는 미생물의 대사산물을 PHA 모노머로 전환하여 주는 효소와 PHA 모노머를 이용하여 PHA 고분자를 합성하는 PHA 합성효소가 필수적인데, PHA 모노머를 제공하는 것으로 알려진 효소는 아에로모나스 속 미생물과 슈도모나스 속 미생물에서 발견된 (R)-특이적 에노일-CoA 히드라타제((R)-specific enoyl-CoA hydratase), 대장균과 슈도모나스속 미생물에서 발견된 3-케토아실-ACP 환원효소(3-ketoacyl-ACP reductase)가 알려져 있다(참조: Fukui et al., J. Bacteriol., 180:667-673, 1998; Tsuge et al., FEMS Microbiol. Lett., 184: 193-198, 2000; Taguchi et al., FEMS Microbiol. Lett., 176: 183-190, 1999; Ren et al., J. Bacteriol., 182:2978-2981, 2000; Park et al., FEMS Microbiol. Lett., 214:217-222, 2002).

<8> 한편, MCL-PHA를 합성하는 유전자는 슈도모나스 속 미생물로부터 클로닝되었

고, 전기 유전자를 이용하여 형질전환된 재조합 미생물을 이용하여 MCL-PHA를 합성할 수 있다고 보고되었다(참조: Qi et al., FEMS Microbiol. Lett., 157:155-162, 1997; Qi et al., FEMS Microbiol. Lett., 167:89-94, 1998; Langenbach et al., FEMS Microbiol. Lett., 150:303-309, 1997; WO 01/55436; USP 6,143,952; WO 98/54329; WO 99/61624). 또한, 지방산 분해경로의 효소 중 FadB가 제거된 재조합 대장균을 이용할 경우에도, MCL-PHA가 생산될 수 있음이 보고되었다(참조: Langenbach et al., FEMS Microbiol. Lett., 150:303-309, 1997). 그러나, 전기 FadB가 제거된 재조합 대장균을 이용할 경우, 3-케토아실-ACP 환원효소가 PHA 모노머를 제공하지 않는다는 것이 동시에 보고되었기 때문에, PHA 모노머를 제공하는 새로운 효소가 존재함이 예측되었다. 전기 FadB가 제거된 재조합 대장균을 이용할 경우, MCL-PHA를 효율적으로 생산할 수 있기 때문에, 전기 FadB가 제거된 재조합 대장균에서 PHA 모노머를 제공하는 효소를 규명하려는 노력이 계속되었으나, 아직까지 별다른 성과가 없는 실정이다.

<9> 따라서, 대장균에서 PHA 모노머를 제공하는 새로운 효소를 규명하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 이에, 본 발명자들은 대장균에서 PHA 모노머를 제공하는 새로운 효소를 규명하고자 예의 연구노력한 결과, 아직까지 기능이 밝혀지지 않은 대장균의 유전자인 *maoC* 로부터 발현된 단백질이 FadB가 제거된 재조합 대장균에서 PHA 모노머를 제공하는 효소역할을 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<11> 결국, 본 발명의 첫 번째 목적은 PHA 모노머를 제공하는 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 두 번째 목적은 전기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

<13> 본 발명의 세 번째 목적은 전기 발현벡터로부터 발현된 단백질을 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 네 번째 목적은 전기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 다섯 번째 목적은 전기 발현벡터를 이용하여, PHA를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 여섯 번째 목적은 전기 제조방법으로 제조된 PHA를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 본 발명의 MaoC를 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 생산방법은 대장균에서 *fadB* 유전자를 제거하는 단계; 전기 *fadB* 유전자가 제거된 대장균을 *maoC* 유전자를 포함하는 발현벡터와 폴리히드록시알칸산(PHA) 합성유전자를 포함하는 발현벡터로 동시에 형질전환시켜서 형질전환체를 수득하는 단계; 및, 수득한 형질전환체를 C_{6-10}의 탄소원이 포함된 배지에 배양하고, 이로부터 C_{6-10}의 탄소수를 가지는 모노머로 구성된 PHA를 수득하는 단계를 포함한다: 이때, PHA 합성유전자가 특별히 제한되는 것은 아니나, *phaC* 을 사용함이 바람직하다.

<18> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<19> 쯔게(Tsuge) 등은 슈도모나스 속 미생물로부터 PHA의 합성에 관여하는 에노일-CoA 히드라타제(enoyl-CoA hydratase)를 보고하였다(참조: Tsuge et al., FEMS Microbiol. Lett., 184:193-198, 2000). 본 발명자들은 대장균에서 PHA 모노머를 제공하는 새로운 효소를 규명하고자, 전기 보고된 에노일-CoA 히드라타제의 아미노산 서열을 이용하여, 대장균에서 발현되고, 높은 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 검색하였다. 그 결과, 34%의 상동성을 나타내는 MaoC 단백질(서열번호 1)과 이를 암호화하는 유전자(서열번호 2)를 찾을 수 있었다. 아직까지, MaoC 단백질의 정확한 기능은 밝혀지지 않았고, 단지 *maoC* 와 *maoA* 유전자가 하나의 오페론으로 이루어져 있다는 것만이 보고되었다(참조: Steinebach et al., Eur. J. Biochem., 237:584-591, 1996).

<20> 본 발명자들은 전기 검색된 단백질이 PHA의 합성에 관여하는 에노일-CoA 히드라타제의 활성을 나타낼 것으로 예측하였고, 이를 확인하기 위하여, MaoC 단백질을 암호화하는 *maoC* 유전자를 클로닝하고자 하였다. 즉, 대장균의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 대장균 유전체서열에 기초하여 합성된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 $maoC_{Ec}$ 유전자를 증폭시켰다(참조: Blattner et al., Science 277:1453-14, 1997). 전기 증폭된 $maoC_{Ec}$ 유전자를 *Sac*I/*Xba*I로 절단하고, p10499A 발현벡터(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호)에 삽입시켜서, p10499MaoC를 작제하고, 전기 p10499MaoC 벡터를 *Eco*RV/*Sca*I으로 절단하여 수득한 유전자 조각을, *Pvu*II/*Dra*I으로 절단한 pACYC184에 삽입하여 *maoC* 유전자를 발현시키기 위한 발현벡터 pACYC104MaoC를 작제하였다.

<21> PHA 합성유전자를 발현할 수 있는 p10499613C2 벡터(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호)를 *Eco*RV/*Ssp*I으로 절단하고, *Eco*RV로 절단한 pBBR1MCS에 삽입시켜서, PHA 합성유전자를 포함하는 재조합 벡터 pMCS104613C2를 작제하였다.

<22> 정(Jeong) 등의 방법에 의하여, *fadB*가 제거된 돌연변이 대장균 WB101(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호)로부터 *maoC*를 제거하여, *fadB*와 *maoC* 가 모두 제거된 돌연변이 대장균 WB106을 작제하였다(참조: Jeong and Lee. Appl. Environ. Microbiol., 68:4979-4985, 2002).

<23> *fadB*만이 제거된 돌연변이 대장균 WB101은 PHA 합성유전자를 포함하는 pMCS104613C2으로 형질전환되었을 때도, 탄소수가 10개인 데카논산으로부터 MCL-PHA를 생산할 수 있었으나, *fadB*와 *maoC* 가 모두 제거된 돌연변이 대장균 WB106은 pMCS104613C2만으로 형질전환될 경우에는 탄소수가 10개인 데카논산으로부터 MCL-PHA를 생산할 수 없었다. 그러나, 전기 WB106을 pMCS104613C2와 pACYC104MaoC로 동시에 형질전환된 재조합 대장균 W3110은 탄소수가 10개인 데카논산으로부터 MCL-PHA를 생산할 수 있었다. 이때, 재조합 대장균의 생산에 사용되는 배지가 특별히 제한되는 것은 아니나, 통상적인 대장균 배양에 사용되는 루리아-버타니(Luria-Bertani, LB)배지(Yeast extract 5g/L, peptone 10g/L, NaCl 5g/L)를 사용함이 바람직하다. 또한, 본 발명에 의하여 생산되는 PHA는 종래의 방법으로 생산된 PHA와 비교하여 제조수율이 우수하고, 모노머로서 3-히드록시헥사노에이트(3-hydroxyhexanoate, 3HHx), 3-히드록시옥타노에이트(3-hydroxyoctanoate, 3HO) 및 3-히드록시데카노에이트(3-hydroxydecanoate, 3HD)를 사용하며, 특히 3HO 및 3HD가 대부분을 차지함을 알 수 있었으므로, 종래의 방법으로 생산된 PHA보다 품질이 우수함을 알 수 있었다.

<24> 이러한 결과에 의하여, 전기 *maoC* 유전자로부터 발현되는 단백질의 효소활성을 측정하기 위하여, 6개의 히스티딘으로 표지된 MaoC 단백질을 발현시키는 발현벡터 pTac99MaoCH를 작제하고, 이를 이용하여 MaoC-His$_6$-Tag을 수득하였다. 전기 MaoC-His$_6$-Tag는 크로토닐-CoA(crotonyl-CoA)를 기질로 사용하여 47.6U/mg의 에노일-CoA 히드라타제(enoyl-CoA hydratase) 활성을 나타내었다. 본 발명에서는, "1U"를 1분당 1μmol의 크로토닐-CoA를 제거하는 효소활성의 단위로 정의한다.

<25> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<26> <u>실시예 1</u>: *maoC* 유전자를 이용한 PHA 생산용 재조합 대장균의 제조

<27> *fadB* 와 *maoC* 가 제거된 돌연변이 대장균, 대장균의 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 MCL-PHA 합성유전자를 함유한 재조합 벡터를 각각 작제하고, 이를 이용하여 MCL-PHA 생산용 재조합 대장균을 제조하였다.

<28> <u>실시예 1-1</u>: *fadB* 와 *maoC* 가 제거된 돌연변이 대장균의 작제

<29> 공지된 방법에 따라, 박테리오파지 λ의 레드 오페론(*red* operon)을 이용하여 대장균에서 *maoC* 유전자를 제거하였다(참조: Jeong and Lee., Appl. Environ. Microbiol., 68:4979-4985, 2002).

<30> 즉, 박테리오파지 λ의 레드오페론(*red* operon)이 함유된 벡터 pTrcEBG로 *fadB*가 제거된 돌연변이 대장균 WB101을 형질전환시키고, IPTG 1mM을 첨가하여 형질전환된 WB101 (pTrcEBG)에서 레드오페론의 발현을 유도하고, 이를 이용하여 컴피턴트 세포(electroporation-competent cell)를 작제하였다.

<31> 한편, *maoC* 유전자는 5'말단으로부터 60bp와 3'말단으로부터 60bp가, 클로람페니콜(chloromphenicol) 저항 유전자의 5'말단으로부터 60bp와 3'말단기로부터 60bp와 유사한 염기서열을 포함하기 때문에, 클로람페니콜 저항 유전자로 *maoC* 유전자를 치환시킴으로써, *maoC* 유전자가 결실된 돌연변이체를 작제할 수 있다. 이를 위하여, pACYC184(New England Biolab, USA)를 주형으로 하고, 프라이머 MaoCdelf: 5'-atgcagcagttagccagtttcttatccggtacctggcagtctggccggggccgtagccgtagc acttcactgacaccctc-3'(서열번호 3)과 프라이머 MaoCdelb: 5'-ttaatcgacaaaatcaccg tgctgcctggccaccagcgtcagaattgaataacttattcaggcgtagcacc-3'(서열번호 4)를 이용하였으며, 94℃에서 50초간 변성, 52℃에서 50초간 서냉복원, 72℃에서 1분간 신장을 한 주기로 하여, 총 30 주기를 반복하면서, PCR을 수행하여, PCR 절편을 수득하였다.

<32> 전기 수득한 PCR 절편을 전기 작제한 컴피턴트 세포에 삽입시켜서, *fadB* 와 *maoC* 가 모두 제거된 돌연변이 대장균 WB106을 작제하였다.

<33> <u>실시예 1-2</u>: 대장균의 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 작제

<34> 먼저, 대장균 W3110의 염색체 DNA를 공지된 방법으로 분리 및 정제하였다(참조: Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989). 전기 정제된 대장균 유전체서열을 주형으로 하고, 프라이머 *maoC* 1: 5'-tttcccgagctcatgcagcagttagccagtt-3'(서열번호 5)과 프라이머 *maoC* 2: 5'-gctctagattaatcgacaaaatcaccgt-3'(서열번호 6)를 이용하였으며, 94℃에서 50초간 변성, 52℃에서 50초간 서냉복원, 72℃에서 2분간 신장을 한 주기로 하여, 총 30 주기를 반복하면서, PCR을 수행하여, PCR 절편을 수득하였다.

<35> 한편, p10499A 벡터(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호)를 *Sac*I/*Xba*I 효소로 절단한 다음, 전기 수득한 PCR 절편을 삽입시켜서, 재조합 벡터 p10499MaoC를 작제하고, 이를 *Eco*RV/*Sca*I으로 절단하여 수득한 절편을 *Pvu*II/*Dra*I으로 절단한 pACYC184에 삽입시켜서, 발현벡터 pACYC104MaoC를 작제하였다(참조: 도 1, 도 2). 도 1은 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 p10499MaoC의 유전자 지도이고, 도 2는 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC104MaoC의 유전자 지도이다.

<36> <u>실시예 1-3</u>: MCL-PHA 합성유전자를 함유한 재조합 벡터의 작제

<37> MCL-PHA 합성유전자의 발현을 위하여, p10499613C2(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호)을 *Eco*RV/*Ssp*I 제한 효소로 절단하여 수득한 유전자 절편을, *Eco*RV로 절단한 pBBR1MCS에 삽입시켜서, MCL-PHA 합성유전자 발현벡터인 pMCS104613C2를 작제하였다(참조: 도 3). 도 3은 PHA 합성 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pMCS104613C2의 유전자 지도이다.

<38> <u>실시예 1-4</u>: 재조합 대장균의 제조

<39> 전기 실시예에서 작제된 *fadB*가 제거된 돌연변이 대장균 WB101와 *fadB* 와 *maoC* 가 모두 제거된 돌연변이 대장균 WB106을 각각 MCL-PHA 합성유전자 발현벡터인 pMCS104613C2, MaoC 발현벡터인 p10499MaoC 및 MaoC 발현벡터인 pACYC104MaoC로 형질전환시켜서, 재조합 대장균 WB101(pMCS104613C2), WB101(pMCS104613C2 + p10499MaoC), WB106(pMCS104613C2) 및 WB106(pMCS104613C2+pACYC104MaoC)을 제조하였으며, 대조군으로는 정상 대장균 W3110을 PHA 합성유전자 발현벡터인 pMCS104613C2와 MaoC 발현 재조합 벡터 p10499MaoC로 형질전환시킨 재조합 대장균인 W3110(pMCS104613C2 + p10499MaoC)을 이용하였다.

<40> <u>실시예 2</u>: 재조합 대장균의 MCL-PHA 합성능 측정

<41> 전기 실시예 1-4에서 각각 제조된 대조군, WB101(pMCS104613C2), WB101(pMCS104613C2 + p10499MaoC), WB106(pMCS104613C2) 및 WB106(pMCS104613C2+pACYC104MaoC)의 MCL-PHA 합성능을 측정하기 위하여, 전기 각 재조합 대장균을 2g/L의 데카논산이 포함된 LB 배지(Yeast extract 5g/L, peptone 10g/L, NaCl 5g/L)에서 4일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양물을 2,500rpm으로 15분동안 원심분리하고 100℃에서 건조하였다. 공지된 방법에 의하여 건조된 균체로부터 MCL-PHA을 분리하고, 이의 함량을 측정하였다(참조: 대한민국 특허출원 제 2002-10325호).

<42> 또한, 전기 분리된 MCL-PHA의 조성을 측정하기 위하여, 분리된 MCL-PHA을 메타놀리시스(methanolysis)시켜서, 3-히드록시알칸산 메틸에스터(3-hydroxyalkanoic acid methyl ester)의 형태로 전환시키고, 가스크로마토그래피(Donan Co., Korea)를 이용하여, 3HB(3-hydroxybutyrate), 3HHx(3-hydroxyhexanoate), 3HO(3-hydroxyoctanoate), 3HD(3-hydroxydecanoate) 및 3HDD(3-hydroxydodecanoate)의 조성비를 측정하였다. 이때, GC 컬럼으로는 실리카 컬럼(fused silica capillary column, Supelco SPBTM-5, 30m 0.32mm ID 0.25m film, USA)을 사용하였고, 벤조산(benzoic acid, Sigma Chem. Co., USA)을 표준물질(internal standard)로 사용하였다(참조: 표 1).

<43> 【표 1】

재조합 대장균에서 생산된 MCL-PHA의 함량(%, w/w) 및 조성비(mol%)

실험군	함량	조성비				
		3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD
대조군	11.9	0	19	74	7	0
WB101 (pMCS104613C2)	44.6	0	9	37	54	0
WB101 (pMCS104613C2 +p10499MaoC)	20.0	0	0	61	39	0
WB106 (pMCS104613C2)	0	0	0	0	0	0
WB106 (pMCS104613C2 +pACYC104MaoC)	10	0	12	38	49	0

<44> 상기 표 1에서 보듯이, 대조군, WB101(pMCS104613C2) 및 WB101(pMCS104613C2 + p10499MaoC)에서는 MCL-PHA가 생산되었으나, MaoC이 결실된 재조합 대장균인 WB106(pMCS104613C2)으로부터는 MCL-PHA가 생성되지 않았다. 그러나, MaoC이 결실된 재조합 대장균에 MaoC를 삽입시킨 재조합 대장균 WB106(pMCS104613C2+pACYC104MaoC)에서는 다시 MCL-PHA가 생산되었으므로, MaoC가 MCL-PHA의 생산에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다.

<45> MCL-PHA의 생산에 있어서, 랑거바흐(Langenbach) 등은 *phaC1*$_{Pa}$ 유전자를 포함하는 발현 벡터 pBHR71로 형질전환된 *fadB* 돌연변이 대장균을 이용하여, 세포건조중량의 21.1%(w/w)의 함량으로 MCL-PHA를 생산하였고(참조: Langenbach et al., FEMS Microbiol. Lett., 150:303-309, 1997), 쯔게(Tsuge) 등은 슈도모나스 유래의 PHA 합성 유전자와 슈도모나스 유래의 (R)-특이적 에노일-CoA 히드라타제((R)-specific enoyl-CoA hydratase)인 PhaJ1와 PhaJ2를 발현시키는 재조합 대장균을 이용하여 세포건조중량의 14 및 29%(w/w)의 함량으로 MCL-PHA를 생산하였으며, 생산된 PHA는 주로 6개의 탄소를 가지

는 모노머로 구성됨을 보고하였다(참조: Tsuge et al. FEMS Microbiol. Lett., 184:193-198, 2000).

<46> 이러한 종래의 기술과 본 발명을 비교하면, 본 발명의 방법을 이용하여 종래의 MCL-PHA 함량(14, 21.1 및 29%(w/w))보다 높은 함량(44.6%(w/w))으로 MCL-PHA를 생산할 수 있었고, 종래의 방법으로 생산된 MCL-PHA가 주로 6개의 탄소를 가지는 모노머로 구성됨에 비하여, 본 발명의 방법으로 생산된 MCL-PHA는 6개 내지 10개의 탄소를 가지는 모노머(3HHx, 3HO, 3HD)로 구성되고, 특히 8개 내지 10개의 탄소를 가지는 모노머(3HO, 3HD)를 다량으로 포함하기 때문에, 6개의 탄소를 가지는 모노머로 구성된 종래의 방법으로 생산된 PHA보다 그 응용분야가 현저히 넓다는 것을 알 수 있었다.

<47> <u>실시예 3</u>: MaoC의 에노일-CoA 히드라타제 활성(enoyl-CoA hydratase activity) 측정

<48> *maoC* 프라이머 2 대신에, 프라이머 His-Tag: 5'-gctctagattaatggtgatgatggt gatgatcgacaaaatcaccg-3'(서열번호 7)를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1-2와 동일한 방법을 이용하여, PCR 절편을 수득하였다. 또한, 택 프로모터(

tac promoter)를 포함하는 pTac99A 벡터를 *Sac*I/*Xba*I으로 절단하고, 전기 수득한 PCR 절편을 삽입하여 발현벡터 pTac99MaoCH를 작제하였다(참조: 도 4). 도 4는 *maoC* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pTac99MaoC의 유전자 지도이다. 전기 발현벡터로 대장균 DH5α를 형질전환시켜서, 재조합 대장균 DH5α(pTac99MaoCH)를 제조하고, 이를 LB 배지에서 1일동안 배양한 후, IPTG 1mM을 첨가하여, 단백질 발현을 유도한 다음, 균체를 수득하고, 균체를 분쇄하여 수득한 분쇄물을 NTA 컬럼(Qiagen Ni-NTA kit, USA)에 적용하여 6개의 히스티딘을 포함하는 MaoC 단백질을 정제하였다.

<49> 전기 정제된 MaoC 단백질과 기질인 0.25 mM 크로토닐-CoA(crotonyl-CoA)를 반응완충용액(50mM Tris-HCl, pH 8.0)에 첨가하여 혼합하고, 반응시키면서, 263nm의 파장에서 흡광도가 감소하는 것을 이용하여 에노일-CoA 히드라타제 활성을 측정하였다. 이때, 생성물인 에노일-CoA 티오에스터(enoyl-CoA thioester)의 ε_{263} 은 6700 $M^{-1}cm^{-1}$로 계산하였다. 그 결과, MaoC 단백질은 크로토닐-CoA에 대하여, 47.6U/mg의 에노일-CoA 히드라타제 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<50> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 대장균에서 발현되는 MaoC 단백질을 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 제조방법 및 전기 방법으로 제조된 PHA에 관한 것이다. 본 발명의 MaoC를 이용한 폴리히드록시알칸산(PHA)의 생산방법은 대장균에서

fadB 유전자를 제거하는 단계; 전기 *fadB* 유전자가 제거된 대장균을 *maoC* 유전자를 포함하는 발현벡터와 폴리히드록시알칸산(PHA) 합성유전자를 포함하는 발현벡터로 동시에 형질전환시켜서 형질전환체를 수득하는 단계; 및, 수득한 형질전환체를 C_{6-10}의 탄소원이 포함된 배지에 배양하고, 이로부터 C_{6-10}의 PHA를 수득하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 지금까지 기능이 규명되지 않았던 MaoC 단백질을 이용할 경우, 종래의 PHA보다 많은 탄소수를 가지는 고품질의 PHA를 보다 높은 효율로 생산할 수 있으므로, 고품질의 PHA의 제조에 널리 활용될 수 있을 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2의 염기서열을 가지고, 중간사슬 폴리히드록시알칸산(MCL-PHA, medium-chain-length polyhydroxyalkanoate) 합성에 필요한 모노머를 제공하는 단백질을 암호화하는 *maoC* 유전자.

【청구항 2】

제 1항의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 3】

제 1항의 유전자로부터 발현되고, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 에노일-CoA 히드라타제 활성(enoyl-CoA hydratase activity)을 나타내는 단백질 MaoC.

【청구항 4】

제 2항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환 미생물.

【청구항 5】

(i) 대장균에서 *fadB* 유전자를 제거하는 단계;

(ii) 전기 *fadB* 유전자가 제거된 대장균을 제 1항의 *maoC* 유전자를 포함하는 발현벡터와 폴리히드록시알칸산(PHA) 합성유전자를 포함하는 발현벡터로 동시에 형질전환시켜서 형질전환체를 수득하는 단계; 및,

(iii) 수득한 형질전환체를 C_{6-10}의 탄소원이 포함된 배지에 배양하고, 이로부터 C_{6-10}의 탄소수를 가지는 모노머로 구성된 PHA를 수득하는 단계를 포함하는, MaoC를 이용한 PHA의 생산방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

폴리히드록시알칸산 (PHA) 합성유전자는 *phaC* 인 것을 특징으로 하는

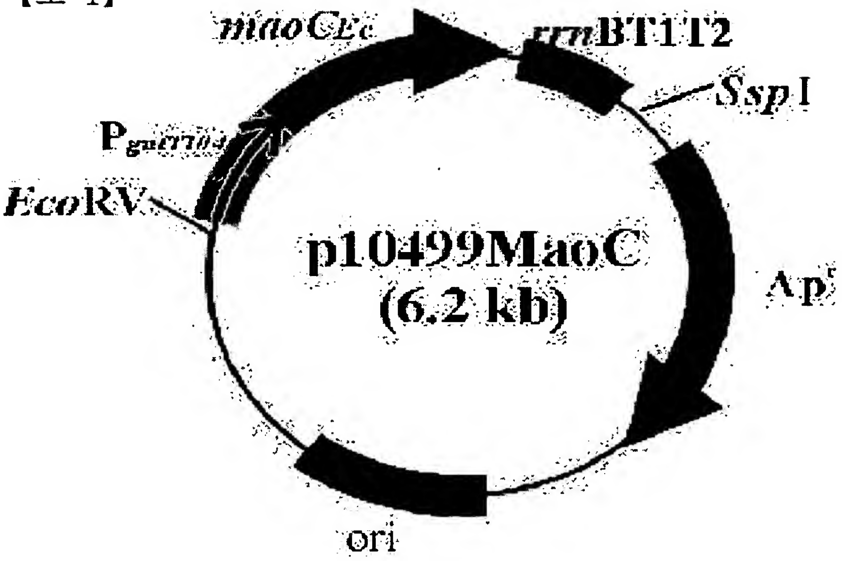
MaoC를 이용한 PHA의 생산방법.

【청구항 7】

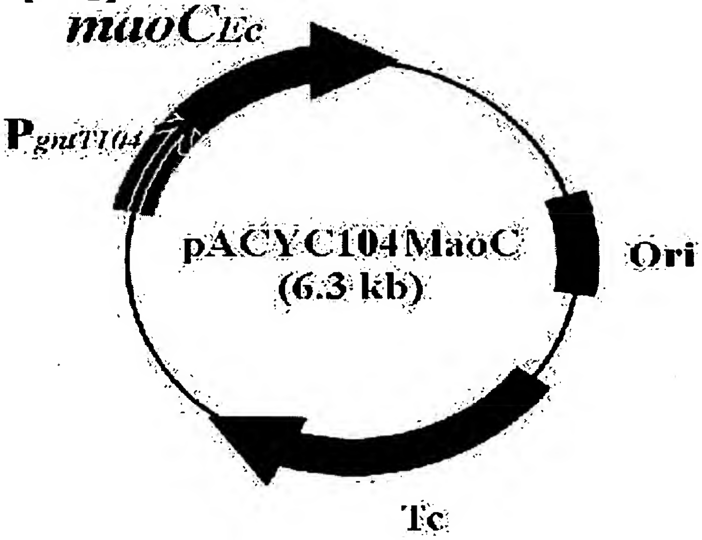
제 5항의 방법으로 제조되어, C_{6-10}의 탄소수를 가지는 모노머로 구성된 폴리히드록시알칸산.

【도면】

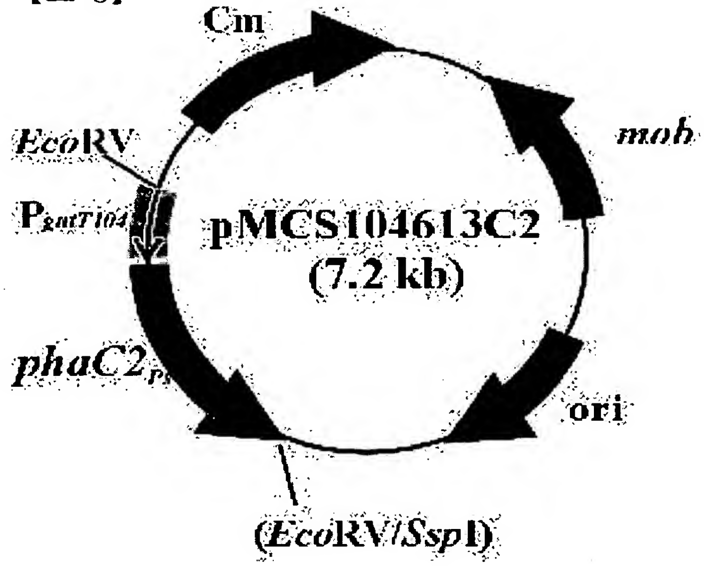
【도 1】


maoCEc
rrnBT1T2
SspI
PgntT104
EcoRV
p10499MaoC
(6.2 kb)
Ap
ori

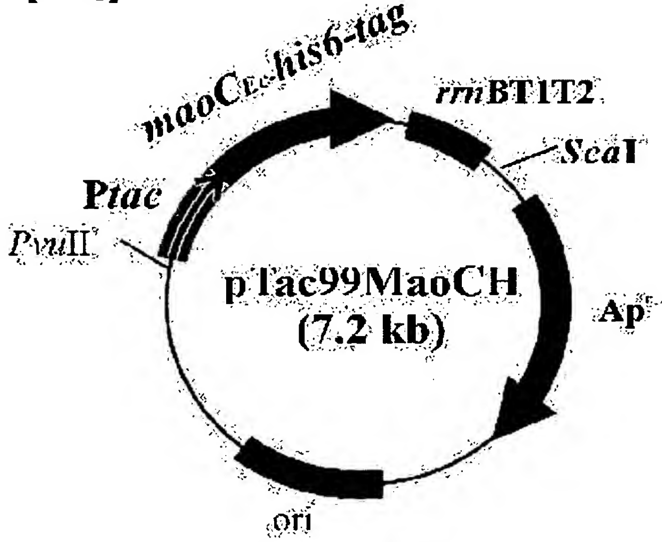
【도 2】


maoCEc
PgntT104
pACYC104MaoC
(6.3 kb)
Ori
Tc

【도 3】



【도 4】



【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Sicence and Technology <120> Process for Preparing Polyhydroxyalkanoate Employing MaoC protein <160> 7 <170> KopatentIn

1.6 <210> 1 <211> 681 <212> PRT <213> MaoC in E. Coli <400> 1 Met

Gln Gln Leu Ala Ser Phe Leu Ser Gly Thr Trp Gln Ser Gly Arg 1 5

10 15 Gly Arg Ser Arg Leu Ile His His Ala Ile Ser Gly Glu Ala Leu

Trp 20 25 30 Glu Val Thr Ser Glu Gly

Leu Asp Met Ala Ala Ala Arg Gln Phe Ala 35 40

45 Ile Glu Lys Gly Ala Pro Ala Leu Arg Ala Met Thr Phe Ile Glu Arg 50

55 60 Ala Ala Met Leu Lys Ala Val Ala Lys His Leu Leu Ser Glu Lys

Glu 65 70 75 80 Arg Phe Tyr Ala

Leu Ser Ala Gln Thr Gly Ala Thr Arg Ala Asp Ser 85

90 95 Trp Val Asp Ile Glu Gly Gly Ile Gly Thr Leu Phe Thr Tyr Ala

Ser 100 105 110 Leu Gly Ser Arg Glu Leu

Pro Asp Asp Thr Leu Trp Pro Glu Asp Glu 115 120

125 Leu Ile Pro Leu Ser Lys Glu Gly Gly Phe Ala Ala Arg His Leu Leu 130

135 140 Thr Ser Lys Ser Gly Val Ala Val His Ile Asn Ala Phe Asn Phe

Pro 145 150 155 160 Cys Trp Gly Met

Leu Glu Lys Leu Ala Pro Thr Trp Leu Gly Gly Met 165

170 175 Pro Ala Ile Ile Lys Pro Ala Thr Ala Thr Ala Gln Leu Thr Gln

Ala 180 185 190 Met Val Lys Ser Ile Val

Asp Ser Gly Leu Val Pro Glu Gly Ala Ile 195 200

205 Ser Leu Ile Cys Gly Ser Ala Gly Asp Leu Leu Asp His Leu Asp Ser 210

215 220 Gln Asp Val Val Thr Phe Thr Gly Ser Ala Ala Thr Gly Gln Met

Leu 225 230 235 240 Arg Val Gln Pro

Asn Ile Val Ala Lys Ser Ile Pro Phe Thr Met Glu 245

250 255 Ala Asp Ser Leu Asn Cys Cys Val Leu Gly Glu Asp Val Thr Pro

Asp 260 265 270 Gln Pro Glu Phe Ala Leu

Phe Ile Arg Glu Val Val Arg Glu Met Thr 275 280

285 Thr Lys Ala Gly Gln Lys Cys Thr Ala Ile Arg Arg Ile Ile Val Pro 290

295 300 Gln Ala Leu Val Asn Ala Val Ser Asp Ala Leu Val Ala Arg Leu

Gln 305 310 315 320 Lys Val Val Val

Gly Asp Pro Ala Gln Glu Gly Val Lys Met Gly Ala 325

330 335 Leu Val Asn Ala Glu Gln Arg Ala Asp Val Gln Glu Lys Val Asn

Ile 340 345 350 Leu Leu Ala Ala Gly Cys

Glu Ile Arg Leu Gly Gly Gln Ala Asp Leu 355 360

365 Ser Ala Ala Gly Ala Phe Phe Pro Pro Thr Leu Leu Tyr Cys Pro Gln 370

375 380 Pro Asp Glu Thr Pro Ala Val His Ala Thr Glu Ala Phe Gly Pro

Val 385 390 395 400 Ala Thr Leu Met

Pro Ala Gln Asn Gln Arg His Ala Leu Gln Leu Ala 405

410 415 Cys Ala Gly Gly Gly Ser Leu Ala Gly Thr Leu Val Thr Ala Asp

Pro 420 425 430 Gln Ile Ala Arg Gln Phe

Ile Ala Asp Ala Ala Arg Thr His Gly Arg 435 440

445 Ile Gln Ile Leu Asn Glu Glu Ser Ala Lys Glu Ser Thr Gly His Gly 450

455 460 Ser Pro Leu Pro Gln Leu Val His Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly

Gly 465 470 475 480 Gly Glu Glu Leu

Gly Gly Leu Arg Ala Val Lys His Tyr Met Gln Arg 485

490 495 Thr Ala Val Gln Gly Ser Pro Thr Met Leu Ala Ala Ile Ser Lys

Gln 500 505 510 Trp Val Arg Gly Ala Lys

Val Glu Glu Asp Arg Ile His Pro Phe Arg 515 520

525 Lys Tyr Phe Glu Glu Leu Gln Pro Gly Asp Ser Leu Leu Thr Pro Arg 530

535 540 Arg Thr Met Thr Glu Ala Asp Ile Val Asn Phe Ala Cys Leu Ser

Gly 545 550 555 560 Asp His Phe Tyr

Ala His Met Asp Lys Ile Ala Ala Ala Glu Ser Ile 565

570 575 Phe Gly Glu Arg Val Val His Gly Tyr Phe Val Leu Ser Ala Ala

Ala 580 585 590 Gly Leu Phe Val Asp Ala

Gly Val Gly Pro Val Ile Ala Asn Tyr Gly 595 600

605 Leu Glu Ser Leu Arg Phe Ile Glu Pro Val Lys Pro Gly Asp Thr Ile 610

615 620 Gln Val Arg Leu Thr Cys Lys Arg Lys Thr Leu Lys Lys Gln Arg

Ser 625 630 635 640 Ala Glu Glu Lys

Pro Thr Gly Val Val Glu Trp Ala Val Glu Val Phe 645

650 655 Asn Gln His Gln Thr Pro Val Ala Leu Tyr Ser Ile Leu Thr Leu

Val 660 665 670 Ala Arg Gln His Gly Asp

Phe Val Asp 675 680 <210> 2 <211> 2046 <212>

DNA <213> MaoC in E. Coli <400> 2 atgcagcagt tagccagttt cttatccggt acctggcagt

ctggccgggg ccgtagccgt 60 ttgattcacc acgctattag cggcgaggcg ttatgggaag

tgaccagtga aggtcttgat 120 atggcggctg cccgccagtt tgccattgaa aaaggtgccc

ccgcccttcg cgctatgacc 180 tttatcgaac gtgcggcgat gcttaaagcg gtcgctaaac

atctgctgag tgaaaaagag 240 cgtttctatg ctctttctgc gcaaacaggc gcaacgcggg

cagacagttg ggttgatatt 300 gaaggtggca ttgggacgtt atttacttac gccagcctcg

gtagccggga gctgcctgac 360 gatacgctgt ggccggaaga tgaattgatc cccttatcga

aagaaggtgg atttgccgcg 420 cgccatttac tgacctcaaa gtcaggcgtg gcagtgcata

ttaacgcctt taacttcccc 480 tgctggggaa tgctggaaaa gctggcacca acgtggctgg

gcggaatgcc agccatcatc 540 aaaccagcta ccgcgacggc ccaactgact caggcgatgg

tgaaatcaat tgtcgatagt 600 ggtcttgttc ccgaaggcgc aattagtctg atctgcggta

gtgctggcga cttgttggat 660 catctggaca gccaggatgt ggtgactttc acggggtcag

cggcgaccgg acagatgctg 720 cgagttcagc caaatatcgt cgccaaatct atccccttca

ctatggaagc tgattccctg 780 aactgctgcg tactgggcga agatgtcacc ccggatcaac

cggagtttgc gctgtttatt 840 cgtgaagttg tgcgtgagat gaccacaaaa gccgggcaaa

aatgtacggc aatccggcgg 900 attattgtgc cgcaggcatt ggttaatgct gtcagtgatg

ctctggttgc gcgattacag 960 aaagtcgtgg tcggtgatcc tgctcaggaa ggcgtgaaaa

tgggcgcact ggtaaatgct 1020 gagcagcgtg ccgatgtgca ggaaaaagtg aacatattgc

tggctgcagg atgcgagatt 1080 cgcctcggtg gtcaggcgga tttatctgct gcgggtgcct

tcttcccgcc aaccttattg 1140 tactgtccgc agccggatga aacaccggcg gtacatgcaa

cagaagcctt tggccctgtc 1200 gcaacgctga tgccagcaca aaaccagcga catgctctgc

aactggcttg tgcaggcggc 1260 ggtagccttg cgggaacgct ggtgacggct gatccgcaaa

ttgcgcgtca gtttattgcc 1320 gacgcggcac gtacgcatgg gcgaattcag atcctcaatg

aagagtcggc aaaagaatcc 1380 accgggcatg gctccccact gccacaactg gtacatggtg

ggcctggtcg cgcaggaggc 1440 ggtgaagaat taggcggttt acgagcggtg aaacattaca

tgcagcgaac cgctgttcag 1500 ggtagtccga cgatgcttgc cgctatcagt aaacagtggg

tgcgcggtgc gaaagtcgaa 1560 gaagatcgta ttcatccgtt ccgcaaatat tttgaggagc

tacaaccagg cgacagcctg 1620 ttgactcccc gccgcacaat gacagaggcc gatattgtta

actttgcttg cctcagcggc 1680 gatcatttct atgcacatat ggataagatt gctgctgccg

aatctatttt cggtgagcgg 1740 gtggtgcatg ggtattttgt gctttctgcg gctgcgggtc

tgtttgtcga tgccggtgtc 1800 ggtccggtca ttgctaacta cgggctggaa agcttgcgtt

ttatcgaacc cgtaaagcca 1860 ggcgatacca tccaggtgcg tctcacctgt aagcgcaaga

cgctgaaaaa acagcgtagc 1920 gcagaagaaa aaccaacagg tgtggtggaa tgggctgtag

aggtattcaa tcagcatcaa 1980 accccggtgg cgctgtattc aattctgacg ctggtggcca

ggcagcacgg tgattttgtc 2040 gattaa

2046 <210> 3 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer MaoCdelf <400> 3 atgcagcagt tagccagttt cttatccggt acctggcagt ctggccgggg

ccgtagccgt 60 agcacttcac tgacaccctc

80 <210> 4 <211> 71 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer MoaCdelb <400> 4 ttaatcgaca aaatcaccgt gctgcctggc caccagcgtc agaattgaat

aacttattca 60 ggcgtagcac c

71 <210> 5 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer MaoC 1 <400> 5 tttcccgagc tcatgcagca gttagccagt t

31 <210> 6 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer MaoC 2 <400> 6 gctctagatt aatcgacaaa atcaccgt

28 <210> 7 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer His-Tag <400> 7 gctctagatt aatggtgatg atggtgatga tcgacaaaat caccg

45